

M
E
N
U

eRed Folder :

[Previous Doc](#) [Next Doc](#) [Go to Doc#](#)
[First Hit](#)

L4: Entry 13 of 16

File: JPAB

Mar 4, 1986

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 61044826 A

TITLE: GAMMA-INTERFERON COMPOSITION

Abstract Text (2):

CONSTITUTION: An amino acid (e.g. monoamino-aliphatic amino acid) is added to an aqueous solution containing human γ -type interferon [e.g. des(Cys-Tyr-Cys)IFN- γ] and essentially free of inorganic salt. The mixture is frozen and if necessary, dried under reduced pressure to obtain the human IFN- γ composition. The specific activity of the human IFN- γ is $1\times 10^5\sim 1\times 10^7$ IU/mg, and that of the aqueous solution of the human IFN- γ is preferably $1\times 10^2\sim 1\times 10^7$ IU/ml. The loss of IFN- γ in the freezing and freeze-drying procedures can be decreased and a stable composition forming clear solution by dissolution can be prepared by using the aqueous solution of IFN- γ having decreased inorganic salt concentration (preferably $\geq 0.05M$).

Application Date (1):

19850704

[Previous Doc](#) [Next Doc](#) [Go to Doc#](#)

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 昭61-44826

⑬ Int. Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	⑭ 公開 昭和61年(1986)3月4日
A 61 K 45/02		7043-4C	
C 07 K 15/26		6464-4H	
C 12 N 15/00		7115-4B	
// C 12 P 21/00		7235-4B	審査請求 未請求 発明の数 3 (全12頁)

⑮ 発明の名称 γ 型インターフェロン組成物

⑯ 特願 昭60-148093

⑰ 出願 昭60(1985)7月4日

優先権主張 ⑱ 1984年7月10日 ⑲ 世界知的所有権機関(WO) ⑳ PCT/JP84/00352
 ⑲ 1985年4月12日 ⑲ 世界知的所有権機関(WO) ⑳ PCT/JP85/00190

㉑ 発明者 赤木 弥三郎 高槻市松が丘3丁目18番18号
 ㉑ 発明者 三浦 泰幹 川西市清和台西2丁目4番地の43
 ㉑ 発明者 星野 哲夫 豊中市寺内2丁目13番37号
 ㉒ 出願人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地
 ㉒ 代理人 弁理士 天井 作次

明細書

1. 発明の名称

γ 型インターフェロン組成物

2. 特許請求の範囲

- (1) 実質的に無機塩が存在せず、アミノ酸が共存する条件下に凍結もしくは凍結乾燥したヒト γ 型インターフェロン組成物。
- (2) アミノ酸がモノアミノ脂肪族アミノ酸である特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (3) ヒト γ 型インターフェロンが遺伝子組み換え技術で得られるヒト γ 型インターフェロンである特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (4) 遺伝子組み換え技術で得られるヒト γ 型インターフェロンの高濃度含有水溶液由来のヒト γ 型インターフェロンである特許請求の範囲第3項記載の組成物。
- (5) ヒト γ 型インターフェロンの比活性が $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ IU/mgである特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (6) ヒト γ 型インターフェロンが水溶液として

$\times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ IU/mlの濃度である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(7) ヒト γ 型インターフェロンが第1図で示される14,6個のアミノ酸配列からなるポリペプチドである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(8) ヒト γ 型インターフェロンがデス(Cys¹-Tyr²-Cys³)IFN- γ である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(9) アミノ酸が水溶液として $5 \sim 50$ mg/mlの濃度である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(10) モノアミノ脂肪族アミノ酸に加えヒト血清アルブミンを含有する特許請求の範囲第2項記載の組成物。

(11) ヒト血清アルブミンが水溶液として $2 \sim 20$ mg/mlの濃度である特許請求の範囲第10項記載の組成物。

(12) モノアミノ脂肪族アミノ酸が中性モノアミノ脂肪族アミノ酸である特許請求の範囲第10項記載の組成物。

特開昭61- 44826(2)

- (13) 中性モノアミノ脂肪族アミノ酸がグリシンである特許請求の範囲第1・2項記載の組成物。
- (14) 水溶液としてpH 4.0～5.0を示すように調整された特許請求の範囲第1・2項記載の組成物。
- (15) モノアミノ脂肪族アミノ酸が酸性モノアミノ脂肪族アミノ酸である特許請求の範囲第1・0項記載の組成物。
- (16) 水溶液としてpH 7.5～8.5を示すように調整された特許請求の範囲第1・5項記載の組成物。
- (17) さらに糖類を含有せしめた特許請求の範囲第2項または第1・0項記載の組成物。
- (18) 糖類が多糖類である特許請求の範囲第1・7項記載の組成物。
- (19) 糖類が水溶液として3～5.0 mg/ml濃度である特許請求の範囲第1・7項記載の組成物。
- (20) 無機塩の濃度が水溶液として0.1M以下である特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (21) 無機塩の濃度が水溶液として0.05M以下である

特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(22) 無機塩の濃度が水溶液として1mM以下である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(23) 液結品である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(24) 液結乾燥品である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(25) ヒト α 型インターフェロンを含有する実質的に無機塩が存在しない水溶液にアミノ酸を添加して凍結し、所望により得られる液結組成物を減圧下乾燥することを特徴とする実質的に無機塩が存在せず、アミノ酸が共存する条件下に凍結もしくは液結乾燥したヒト α 型インターフェロン組成物の製造法。

(26) ヒト α 型インターフェロンを含有する実質的に無機塩が存在しない水溶液にアミノ酸を添加して凍結し、所望により得られる液結組成物を減圧下乾燥することを特徴とするヒト α 型インターフェロンの安定化法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、ヒト α 型インターフェロン組成物に関する。

従来の技術

ヒトインターフェロンは現在、 α 型、 β 型および γ 型の3種類に分類されている。 α 型および β 型インターフェロンは比較的安定で、主として非経口投与剤の形態で臨床に供せられ、組織的臨床研究も進んでいる。一方、 γ 型インターフェロン($\text{IFN}-\gamma$ と略称することがある)は極めて不安定で、水溶液の保存、凍結あるいは液結乾燥の操作において、容易にその活性を減じ、また液結乾燥品を再溶解した液に漏りを認める等の問題点を有し、臨床使用するに倣する安定な組成物を得ることを、極めて困難にしている。その為、インターフェロンの中でも著しく強い抗ウイルス作用や抗腫瘍作用[サルビンら、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスチチュート、第55巻、1233頁(1975)]を有し、医薬として最も期待の大きい $\text{IFN}-\gamma$ の臨床応用への大きな妨げ

となっている。

ところで、製剤に供せられるインターフェロンの原体は通常、粗インターフェロンから各種のクロマトグラフィー等を駆使した分離・精製工程を経て高純度のものとして得られる。本分離・精製工程では、種々の無機、有機化合物が使用され、例えばpHおよびイオン強度の調整に用いられた無機イオンも精製インターフェロン水溶液中に存在するが、該無機イオン(無機塩)は製剤化の場合にも、安定化剤等として有利に作用すると考えられていた。

たとえば、糖鎖を持たない β 型インターフェロンにおいては、無機塩を添加することにより安定化されるとの知見が開示されている(特開昭59-25364号公報)。

発明が解決しようとする問題点

本発明者らはかかる技術背景下、無機塩の濃度を低下せしめた $\text{IFN}-\gamma$ 水溶液を用いて製剤化すると意外にも、液結および液結乾燥の操作において、従来の無機塩含有 $\text{IFN}-\gamma$ 水溶液の上記

特開昭61-44826(3)

操作におけるよりも、一層 IFN- γ 活性の低下が少なく、また得られた粗成物を再溶解した液に継りを認めることがない安定な IFN- γ 組成物が得られることを見い出し、さらに研究を重ね本発明を完成した。

問題を解決するための手段

本発明は、実質的に無機塩が存在せず、アミノ酸が共存する条件下に凍結もしくは凍結乾燥したヒト γ 型インターフェロン組成物を提供するものである。

本発明に用いられる IFN- γ は、ヒト由来のものであれば天然の、あるいは遺伝子組み換え技術で得られるいずれの IFN- γ でもよい。とりわけ遺伝子組み替え技術で得られるヒト IFN- γ (rIFN- γ)が有利に使用される。

より具体的には、上記 rIFN- γ は、第1図で示される 146 個のアミノ酸からなるポリペプチドやそのポリペプチドの種々のフラグメントを包含する。種々のフラグメントとしては、例えば上記ポリペプチドの N末端部分の 4 個以下のア

ミノ酸が欠落した N 末端部欠落スピーザーズや上記ポリペプチドもしくは N 末端欠落スピーザーズの第 131 番アミノ酸残基以降の部位で切断された C 末端部欠落スピーザーズなどが挙げられる。さらに上記 rIFN- γ は上記ポリペプチドのシスティン残基がセリンもしくはスレオニンに置換されたものも包含する。

上記種々のフラグメントの中では、第1図で示される 146 個のアミノ酸からなるポリペプチドの N 末端部分の 4 個以下のアミノ酸が欠落した N 末端部欠落スピーザーズまたは当該 N 末端部欠落スピーザーズの C 末端部分が切断されたものが好ましい。

とりわけ本発明のヒト IFN- γ としては第1図で示される 146 個のアミノ酸からなるポリペプチドまたはそのポリペプチドの Cys-Tyr-Cys 欠落スピーザーズ [デス(Cys-Tyr-Cys) IFN- γ] が好ましい。

また遺伝子組み換え技術で得られるヒト IFN

- γ を高濃度に含有する水溶液が有利に使用される。

ヒト IFN- γ の非活性は、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ 国際単位/mg (IU/mg) であることが好ましく、IFN- γ 水溶液としては、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ IU/ml、とりわけ $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ IU/ml の活性を有するものが好ましい。

上記 IFN- γ 水溶液として実質的に無機塩を含有しないものが用いられるが、ここで無機塩の濃度は 0.1M 以下であればよく、0.05M 以下、とりわけ 0.01M 以下であることが好ましい。また無機イオン強度としては、無機イオンから計算されるイオン強度が 0.1 以下であればよく、0.05 以下、とりわけ 0.01 以下であることが好ましい。さらに凍結乾燥組成物においては、その全重量に対し、無機塩が 3.0% 以下であればよく 1.5% 以下、とりわけ 0.3% 以下であることが好ましい。

実質的に無機塩を含まない IFN- γ 水溶液は、たとえば IFN- γ の精製工程とりわけその最終工程のクロマトグラフィー操作で用いる緩衝液と

して無機塩非含有緩衝液を用いることにより、あるいは精製された IFN- γ 水溶液から無機塩を除去することにより製造することができる。

アミノ酸としては、グリシン、 α -アラニン、 β -アラニン、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸などモノアミノ脂肪族アミノ酸が好ましく、とりわけグリシンが好ましい。またこれらの生理学的に許容される塩もしくは誘導体でもよい。これらアミノ酸は 1 種または 2 種以上使用することができ、使用するアミノ酸は市販のものを使用できるが、本組成物を臨床応用するには、非経口投与に用いられる程度の品質のものが好ましい。

アミノ酸はそれらの全量として、IFN- γ 水溶液 1 ml 当り 1 mg 以上、好ましくは 5 ~ 50 mg 配合することが好ましい。

また本発明の組成物は、IFN- γ がシスティン残基を有する場合還元性硫黄化合物を共存せしめてもよい。該還元性硫黄化合物として、グルタチオン(還元型)、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、モノチオグリセロール、ジ

チオスレイトールおよび炭素数1~7のチオアルカン酸が挙げられるがとりわけ、グルタチオン(還元型)が好ましい。還元性硫黄化合物を共存せしめる場合、T-FN-γ水溶液1ml当たり還元性硫黄化合物0.1mg以上、とりわけ0.5~1.0mgが好ましい。

更に他の安定化剤としてヒト血清アルブミン(HSA)または(および)糖類を加えることができる。HSAとしては、いかなるものでもよいが、本組成物を臨床応用するためには、非経口投与に用いる程度の品質のものが好ましい。例えば、健康人血漿を原料としてCohnのエクノール分画第6法によつて、分画精製したもの[ジャーナルオブアメリカンケミカルソサイエティ、第68巻、459~475頁(1946)]が用いられる。またHSAは安定剤としてアセチルトリプトファンナトリウムや、カプリル酸ナトリウムを含有するものであつてもよい。

HSAはT-FN-γ水溶液に対し水溶液1ml当たり1mg以上、とりわけ2mg~20mg含有させるこ

とが好ましい。

本発明の組成物がHSAを含有する場合においては、溶液状態でpH 4.0~5.0または7.5~8.5を示すように調整することが好ましい。より詳しくは、上記アミノ酸類が中性アミノ酸類である場合は、pH 4.0~5.0に、酸性アミノ酸類である場合はpH 7.5~8.5に調整することが好ましい。

糖類としては、例えはデキストラン、ヒドロキシエチル澱粉のような多糖類、ショ糖、マルトースおよび乳糖のような二糖類およびブドウ糖、果糖、マンノースおよびガラクトースのような单糖類から選ばれた1種または2種以上の物質が挙げられる。

上記デキストランおよびヒドロキシエチル澱粉に関し、これらは市販のものを使用できるが、本組成物を臨床応用するためには、代用血漿として非経口投与に用いられる程度の品質のものが好ましい。デキストランは、平均分子量1万~10万、とりわけ4万~7万のものが、ヒドロキシエチル澱粉は、平均分子量1万~20万、とりわけ2万

~6万または20万のものが有利に使用される。

上記した糖類を加える場合は、T-FN-γ水溶液1ml当たり1mg以上、好ましくは3mg~50mg含有させることが好ましい。

本組成物は、更に浸透圧の調整剤としての前記糖類または(および)アミノ酸類等を含有していてもよいが、塩化ナトリウムのような無機塩を添加することは、反って組成物の品質を劣化させるので、好ましくない。上記の好ましい浸透圧の調整剤は該組成物に予め加えておくか、凍結乾燥品を再溶解する溶媒中に加えてよい。

本発明の凍結および凍結乾燥したヒトT-FN-γ組成物は、例えは以下の方法により製造することができる。

実質的に無機塩が存在しないヒトT-FN-γ $\times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ mg/ml含有水溶液に、アミノ酸を1mg/ml以上、好ましくは5~50mg/mlの濃度になるように加える。なお該T-FN-γ含有水溶液には、その製造過程において上記アミノ酸を添加することができ、このアミノ酸をも含

有するT-FN-γ水溶液を用いる場合は、そのまま、または必要により上記アミノ酸の濃度までアミノ酸を追加して以下の工程に付すことができる。

更に上記したHSAや糖類なども合せて加えることができる。

上記T-FN-γ水溶液には0.1mg/ml以上、好ましくは0.5~10mg/mlの還元性硫黄化合物や微量の界面活性剤を含有していてもよく、また上記安定剤と同様、これらを新たに加えることもできる。

また所望によりpH調整を行う場合は、硫酸(塩酸、硫酸など)または(および)無機塩(水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウムなど)水溶液を加え所定のpHに調整する。

本発明の凍結したヒトT-FN-γ組成物は、例えは上記水溶液を通常-80°~-30°Cで凍結することにより製造できる。該凍結組成物は-80°~-10°Cで保管することが好ましい。

本発明の凍結乾燥したヒトT-FN-γ組成物は、例えは上記凍結組成物を常法により減圧乾燥する

か上記水溶液または上記凍結組成物の融解により得られる水溶液を、所望により小分けし、上記同様凍結した後、常法により減圧乾燥することにより製造することができる。

注射用製剤としての本発明の凍結乾燥したヒトI FN-γ組成物を製造する場合は、小分けする前に該組成物水溶液あるいはその成分をそれぞれ除菌ろ過等により精製し、無菌操作によりバイアル瓶等に分注小分けした後上記凍結乾燥処理に付すことが好ましい。

本発明の凍結もしくは凍結乾燥したヒトI FN-γ組成物は、その凍結あるいは凍結乾燥操作および保存中のI FN-γ活性や品質の低下が極めて少なくまたその再溶解時に凝りが生じないため有用である。また凍結乾燥した組成物は、安定化されたヒトI FN-γの粉末として得られとりわけ非経口投与製剤として有利に用いることができる。この場合さらにHSAを加えた組成物は、腸壁への付着が少なく有利に用いることができる。

本発明の凍結乾燥したヒトI FN-γ組成物を

注射用製剤として用いる場合は、通常用時、凍結乾燥組成物をバイアル当り1～100mlの注射用蒸留水またはブドウ糖注射液等に溶解し、溶液の浸透圧が生理的に許容される範囲内で使用する。また適当な担体、賦形剤、希釈剤を用いて眼、耳、鼻内投与用の剤形として用いることができる。

本発明の凍結したもしくは凍結乾燥したヒトI FN-γ組成物は、低毒性で、公知のヒトI FN-γと同様の目的に同様の用法により使用することができる。

本願明細書中、I FN-γの活性(抗ウイルス活性)として国際単位(IU)は以下により求めた。

単位(ユニット)の確定した国際標準I FN-γと目的とする資料をヒト羊膜由来FL細胞株に対するシンドビスウイルス(Sindbis Virus)の細胞変性効果阻止試験を用いて測定し、その比率から力価を算出して求めた。

なお溶液中の蛋白量は、E:280nm=1.0を1ngとして計算して求めた。

作用および実施例

以下に実施例および参考例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例で用いたI FN-γは、特に注意しない場合は、参考例1に記載した方法で製造した実質的に無機塩を含まない高濃度ヒトI FN-γ水溶液を使用した。なお該ヒトI FN-γは第1図に示すアミノ酸配列を有する。

実施例1～8に記載の組成物の製造においては、積極的なpH調整を行なっていないが、これら注射用蒸留水による再溶解時のpHはpH5.5～7の範囲である。

実施例1

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mgを含む 2.4×10^9 I U/mlのヒトI FN-γ水溶液1mlにグリシン1.5mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.5mlを加え、バイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解して、溶液の溶状の肉眼観察とI FN-γの力価測定を行った。その結果は第1表に示す。

実施例2

実施例1において、グリシン1.5mgと共にヒドロキシエチル緩衝粉(平均分子量20万)37.5mgを配合した以外は実施例1と同様に行った。その結果は第1表に示す。

実施例3

実施例1において、グリシンを3.0mgに増量し、更にグルタミン酸ナトリウム7.5mgを配合した以外は実施例1と同様に行った。その結果は第1表に示す。

実施例4

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mgを含む 3.7×10^9 I U/mlのヒトI FN-γ水溶液1mlにグリシン3.0mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.5mlを加え、バイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解して、溶液の溶状の肉眼観察とI FN-γの力価測定を行った。

対象としてグリシンを配合せずに、除菌ろ過してグルタチオン(還元型)3mgを含むヒトI FN-

γ 水溶液1mlをバイアル瓶中で凍結乾燥を行い、同様にIFN- γ の力値を測定した。その結果は第1表に示す。

第1表

実施例	溶状	力値残存率*
1	澄明	100%
2	澄明	94%
3	澄明	104%
4	澄明	98%
4(対照品)	澄明	86%

* 凍結乾燥前の溶液に対する凍結乾燥品の力値残存率

実施例5

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mgを含む 4.6×10^6 U/mlのヒトIFN- γ 水溶液1mlにグリシン3.0mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.5mlを加え、-30°Cに1週間凍結保存した後、IFN- γ の力値を測定した。該凍結品は凍結前の溶液に対して97%の力値を示した。

実施例6

その結果、凍結乾燥前のヒトIFN- γ 溶液の力値に対して94%であった。また40°C1カ月保存後の保存開始時の力値に対する残存率は100%と安定であった。

実施例8

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mg/mlを含む 2.6×10^6 U/mlのヒトIFN- γ 水溶液0.5mlにグルタミン酸ナトリウム1.5mgおよびヒドロキシエチル緩粉(平均分子量4万)1.5mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.25mlを加えバイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水0.5mlで再溶解して溶液が澄明であることを確認し、IFN- γ の力値測定を行った。

その結果、凍結乾燥前のヒトIFN- γ 溶液の力値に対して102%であった。また40°C1カ月保存後の保存開始時の力値に対する残存率は106%と安定であった。

実施例9

グルタチオン(還元型)3mg/mlを含む 3.8×10^6 U/mlのヒトIFN- γ 水溶液0.15ml、H

参考例2で得たヒトIFN- γ 含有溶液を除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mg/mlおよび塩化ナトリウム2.5mg/mlを含む 4.6×10^6 U/mlのヒトIFN- γ 水溶液0.25mlにグリシン1.5mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.75mlを加え、バイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解すると少數の微細不溶物が生じ、そのままこれのIFN- γ の力値測定を行った。

その結果、凍結乾燥前のヒトIFN- γ 溶液の力値に対して98%であった。

実施例7

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mg/mlを含む 2.6×10^6 U/mlのヒトIFN- γ 水溶液0.5mlにグリシン1.0mgおよびヒドロキシエチル緩粉(平均分子量4万)1.5mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.25mlを加えバイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水0.5mlで再溶解して溶液が澄明であることを確認し、IFN- γ の力値測定を行った。

S A 5mg/mlおよびグリシン2.3mg/mlを含有し、0.1N HClでpH4.5に調製した除菌ろ過した水溶液の各1mlをバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解して溶液の溶状の肉眼観察、pHの測定およびIFN- γ の力値測定を行った。その結果は第2表に示す。

実施例10

実施例9において、HSAを1.0mg/mlに増量した以外は実施例9と同様に行った。その結果は第2表に示す。

実施例11

実施例10において、HSAを2.0mg/mlに増量した以外は実施例9と同様に行った。その結果は第2表に示す。

実施例12

実施例9において、更にヒドロキシエチル緩粉(平均分子量4万)を5mg/mlになるように加えた以外は実施例9と同様に行った。その結果は第2表に示す。

実施例13

実施例10においてグリシンのかわりにグルタミン酸ナトリウムを2.7mg/mlになるように加え0.1N NaOH水溶液でpH7.8に調整した以外は実施例10と同様に行った。その結果は第2表に示す。

第2表

実施例	溶状	pH	力価残存率*
9	澄明	4.5	107%
10	澄明	4.4	105%
11	澄明	4.4	98%
12	澄明	4.6	109%
13	澄明	7.5	95%

*:凍結乾燥前の溶液に対する凍結乾燥品の力価残存率

参考例3~5で得た実質的に無機塩を含まない高濃度ヒトFN-γ水溶液を用いても上記実施例と同様の結果が得られる。

実施例14

参考例6に記載の方法で得た 2.5×10^8 IU/mlのデス(lys-Tyr-Cys)1FN-γ水溶液0.25ml、HSA 5mg/mlおよびグリシン2.3mg/mlを含有し、0.1N HClでpH4.5に調整した除菌ろ過した水溶液の各1mlをバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解した。溶液の溶状は澄明で、pH4.5であった。また凍結乾燥する前の水溶液の力価に対する残存率は96%であった。

実施例15

参考例6に記載の方法で得た 2.5×10^8 IU/mlのデス(lys-Tyr-Cys)1FN-γ水溶液0.25ml、ヒドロキシエチル銀粉(平均分子量4万)を1.5mg/mlおよびグリシン2.3mg/mlを含有するように調整された除菌ろ過した水溶液の各1mlをバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。実施例14と同様に再溶解したときの溶液の溶状は澄明でpH6.5であった。また凍結乾燥する前の水溶液の力価に対する残存率は101%であった。

参考例1 実質的に無機塩を含まない高濃度ヒト

FN-γ水溶液の製造

1

(1) EPC 0 089 679号公開公報実施例8の記載に準じ発現用ヒトFN-γ遺伝子を有する菌株R1(pRK248clts, pRC 2.31/HIT-900)を培養してえた凍結菌体1000gに7M塩酸グアニジンおよび2mMフェニルメチルスルホニルフルオライドを含む100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)を3000ml加え、4°Cで1時間振拌したのち遠心分離機(17,000rpm/30分)に付し、澄明な上清液を得た。この上清液を13.7mM塩化ナトリウム、2.7mM塩化カリウム、8mMリン酸二ナトリウムおよび14.7mMリン酸カリウムから成る緩衝液(以下PBSと略す)で70倍に希釈し、生じてくる沈殿物をシャープレス遠心分離機(10,000rpm)に付して除去した。次いでえられた上清液22.0mlをベリコン(ミリボア社製、分画分子量:10,000)で150mlまで濃縮した。この濃縮液を4°Cで一夜放置し、生じた沈殿物をさらにシャープレス遠心分

離機にかけて除去した。この上清液を予め充填した5×30cmの抗体カラム[Ab(Mo, γ2-11.1); EPC 0 103 898号公開公報実施例12参照]に流速1.0ml/minで負荷したのち、PBSの2.500ml、1M塩化ナトリウムおよび0.1%ツイーン20を含んだ10mMリン酸緩衝液(pH7.0)の5,000ml、PBSの2.500mlおよび0.5M塩酸グアニジンを含んだ2.0mMリン酸緩衝液(pH7.0)の2.500mlの各洗浄液を逐次抗体カラムを通過させたのち、2M塩酸グアニジンを含む2.0mMリン酸緩衝液(pH7.0)で溶出し、抗ウイルス活性を有する溶出画分500mlを集めた。

(2) 参考例1(1)の方法で得た溶出画分42.0mlに還元型グルタチオンを10mM追加した。このヒトFN-γ水溶液の42.0mlを予め1mMエチレンジアミン四酢酸塩、15.0mM塩化ナトリウム、1.0mM還元型グルタチオンおよび2M塩酸グアニジンを含んだ2.5mM酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファクリールS-200(ファ

特開昭61-44826(8)

ルマシア社製)のカラム($9 \times 100\text{ cm}$)に負荷し、同一緩衝液で溶出し、モノマー溶出画分 45.0 ml を集めた。本操作により比活性 $3.4 \times 10^6\text{ I U/mg}$ タン白の $\text{rIFN-}\gamma$ ($0.410\text{ mg}/\text{ ml}$)を得た。

(Ⅲ) 参考例1(Ⅱ)でえたヒト $\text{rIFN-}\gamma$ (モノマー)溶出画分 45.0 ml に 1.0 mM 還元型グルタチオン、 1.5 mM 塩化ナトリウム、 0.5 M 塩酸グアニジンおよび 0.01% ツイーン20を含む 2.5 mM 酢酸緩衝液(pH 6.0)の希釈液 3.240 ml を添加、混合し、タン白含量 $0.05\text{ mg}/\text{ ml}$ の低濃度溶液を調整した。この溶液を予め、 1.0 mM 還元型グルタチオン、 1.5 mM 塩化ナトリウムおよび 0.01% ツイーン20を含む 2.5 mM 酢酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したセファデックスG-25のカラム($1.4 \times 100\text{ cm}$)に負荷し、同一緩衝液でゲルろ過を行い、塩酸グアニジンを除去したヒト $\text{rIFN-}\gamma$ の溶出画分 3.180 ml (155.8 mg)を得た。この溶液のタン白含量は $0.049\text{ mg}/\text{ ml}$ であった。タン白回収率は 84.4% であった。その比活性は $3.5 \times 10^6\text{ I U/mg}$ タン白であった。この溶液を 4° C

で 4.8 時間熟成させたのち、ダイアフローPM-10.4.3mmφ(アミコン社製限外ろ過膜)を用い、限外ろ過により 15.9 ml まで濃縮した。この濃縮液は澄明で、そのタン白含量は $0.92\text{ mg}/\text{ ml}$ であった。タン白回収率は 93.9% (146.3 mg)であった。なお、ヒト $\text{rIFN-}\gamma$ の比活性は $6.8 \times 10^6\text{ I U/mg}$ タン白であった。

(Ⅳ) 上記(Ⅲ)の方法で得たヒト $\text{rIFN-}\gamma$ を高濃度に含有する水溶液(タン白含有量: $0.952\text{ mg}/\text{ ml}$)の 3.8 ml を予め 1.0 mM 還元型グルタチオンを含んだ 2.5 mM 酢酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したセファデックスG-25のカラム($5.0 \times 50.0\text{ cm}$)に負荷し、同一緩衝液で展開し、タン白含量 $0.589\text{ mg}/\text{ ml}$ の実質的に無機塩を含まない(1.0 ppm 未満)澄明な $\text{rIFN-}\gamma$ 溶液 5.7 ml を得た。

この $\text{rIFN-}\gamma$ の比活性は $3.7 \times 10^6\text{ I U/mg}$ タン白であった。

参考例2 高濃度 $\text{rIFN-}\gamma$ 水溶液の製造

参考例1(Ⅲ)の方法で得たヒト $\text{rIFN-}\gamma$ を高濃度に含有する水溶液(タン白含有量: $0.952\text{ mg}/\text{ ml}$)

の 3.8 ml を予め 1.0 mM 還元型グルタチオンおよび 1.0 mM 塩化ナトリウムを含んだ 2.5 mM 酢酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム($5.0 \times 50.0\text{ cm}$)に負荷し、同一緩衝液で展開し、タン白含量 $0.658\text{ mg}/\text{ ml}$ の塩化ナトリウムを 0.01 M 含む澄明な $\text{rIFN-}\gamma$ 溶液 5.2 ml を得た。

この $\text{rIFN-}\gamma$ の比活性は $4.6 \times 10^6\text{ I U/mg}$ タン白であった。

参考例3 実質的に無機塩を含まない高濃度 $\text{rIFN-}\gamma$ 水溶液の製造

II

(Ⅰ)特開昭59-80646号公報参考例2に記載の形質転換体エシエリヒアコリ(Escherichia coli)294/pHT1Trp-2101の培養、凍結菌体 1 kg に 7 M 塩酸グアニジンを含む 0.05 M ホウ酸緩衝液(pH 7.2)を 3.000 ml 加え、 4° C で 1 時間攪拌したのち、遠心分離($17,000\text{ rpm}/30\text{ 分}$)にかけ澄明な抽出液 $2,700\text{ ml}$ を得た。この抽出液を 0.137 M 塩化ナトリウム、 2.7 mM 塩化力

リウム、 8 mM リン酸2ナトリウムおよび 1.47 mM リン酸1カリウムから成る緩衝液(以下P.B.Sと略す)で 10 倍に希釈した。次いでこの希釈液にシリカゲル(セパレイション・インダストリーズ社製) 0.4 kg を加え、 4° C で 4.5 分間攪拌、 1.5 分間静置したのち、傾斜法で上液を棄てた。このシリカゲルを 1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.2)で十分洗浄したのち、カラム($1.1 \times 11\text{ cm}$)に充填した。次いで 0.5 M 塩化テトラメチルアンモニウムを含む 0.01 M ホウ酸緩衝液(pH 8.0)で溶出し、溶出液 2.0 l を $5 \times 8\text{ cm}$ の抗体カラム[A b(Mo-γ2-11.1);前出]に負荷、 7.50 ml のP.B.Sで洗浄したのち、 2 M 塩酸グアニジンを含む 0.02 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で溶出し、抗ウイルス(以下AVと略す)活性を有する画分 183 ml を採取した。この溶出液に還元型グルタチオンを 0.01 M 加え(562 mg)を添加して比活性 $2.1 \times 10^6\text{ I U/mg}$ タン白の $\text{rIFN-}\gamma$ 172 mg を含む水溶液を得た。

(Ⅱ) 参照例3(Ⅰ)でえた $\text{rIFN-}\gamma$ 含有水溶

特開昭61-44826(9)

液の18.3mlを予め、1mMエチレンジアミン四酢酸塩、0.15M塩化ナトリウム、0.01M還元型グルタチオンおよび2M酢酸グアニジンを含む2.5mM酢酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したセファクリールS-200(ファルマシア社製)のカラム(9×7.9cm)に負荷し、同一緩衝液で展開し、モノマー溶出画分4.33mlを採集した。このようにしてえられた画分はドデシル硫酸ナトリウムのスラブ電気泳動(以下SDS-PAGEと略す)でモノマーに収斂した。このゲルろ過処理により比活性 3.0×10^6 I U/mg・タン白のrIFN- γ を1.42mg含む水溶液を得た。

(iii) 上記(ii)でえたrIFN- γ 含有水溶液の36.6ml(12.0mg)に0.01M還元型グルタチオンおよび0.5M塩酸グアニジンを含む2.5mM酢酸緩衝液(pH 6.0)の163.4mlを添加し、0.06mg/ml濃度溶液を2.00ml調製した。この溶液を予め0.01M還元型グルタチオンを含む2.5mM酢酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したセファデックスG-25(ファルマシア社製)カラム(5×6.0cm)に負荷し、同一緩

衝液で展開溶出し、rIFN- γ 画分2.20mlを得た。この溶液のrIFN- γ 濃度は0.047mg/mlであった。次いでこの溶液を4°Cで2日間熟成したのち、ダイアフローPM-10膜(アミコン社製限外ろ過法)の限外ろ過法で1.4mlにまで濃縮し、タン白含量0.711mg/mlで実質的に無機塩を含まない(1.0ppm未満)透明なrIFN- γ 溶液を得た。このようにしてえられた高濃度rIFN- γ はSDS-PAGEでモノマーに収斂した。このrIFN- γ の比活性は 3.6×10^6 I U/mg・タン白であった。

参考例4 実質的に無機塩を含まない高濃度rIFN- γ 水溶液の製造

III

参考例1(i)でえたrIFN- γ 水溶液の3.5ml(11.48mg)に0.01M還元型グルタチオンおよび0.5M塩酸グアニジンを含む2.5mM酢酸緩衝液(pH 6.0)の1.65mlを添加して調製した0.057mg/ml濃度溶液2.00mlを予め0.01M還元型グルタチオン溶液(pH 6.0)で平衡化したセファデックスG-

2.5カラム(5×6.0cm)に負荷し、0.01M還元型グルタチオン溶液(pH 6.0)で展開し、rIFN- γ の溶出画分2.35mlを得た。この溶液のrIFN- γ 濃度は0.046mg/mlであった。次いでこの溶液を4°Cで1日間熟成したのち、ダイアフローPM-10膜の限外ろ過法にて1.0mlにまで濃縮し、タン白濃度1.08mg/mlで実質的に無機塩(1.0ppm未満)および酢酸緩衝液を含まない透明なrIFN- γ 水溶液を得た。このようにしてえられたrIFN- γ はSDS-PAGEでモノマーに収斂した。このrIFN- γ の比活性は 3.6×10^6 I U/mg・タン白であった。

参考例5 実質的に無機塩を含まない高濃度rIFN- γ 水溶液の製造

IV

参考例1(i)でえたrIFN- γ の3.5ml(11.48mg)に0.01M還元型グルタチオンおよび0.5M塩酸グアニジンを含む2.5mM酢酸緩衝液(pH 6.0)の1.65mlを添加して、0.057mg/ml濃度の溶液を2.00ml調製した。この溶液を予め0.267Mグ

リシンと0.01M還元型グルタチオンを含む溶液(pH 6.0)で平衡化したセファデックスG-2.5カラム(5×6.0cm)に負荷し、同一溶液で展開し、rIFN- γ の溶出画分2.20mlを得た。この溶液のrIFN- γ 濃度は0.046mg/mlであった。次いでこの溶液を4°Cで2日間熟成したのち、ダイアフローPM-10膜の限外ろ過法で0.4mlにまで濃縮し、タン白含量1.07mg/mlで実質的に無機塩(1.0ppm未満)および酢酸緩衝液を含まない透明なrIFN- γ 溶液を得た。このrIFN- γ はSDS-PAGEでモノマーに収斂し、その比活性は 3.62×10^6 I U/mg・タン白であった。

参考例6

実質的に無機塩を含まない高濃度デス(1-Cys-
2-Tyr-Cys)IFN- γ 水溶液の製造

(i) 形質転換体の製造

IFN- γ 発現プラスミドpRC23/I/FI-900[EPC公開第0089676号公報実施例7参照]を制限酵素NdeI,NcoIで消化し、

特開昭61-44826(10)

T F N - γ 遺伝子部分を含む NdeI - NcoI 7 1.0 bp DNA 断片 (A) を分取した。一方、プラスミド pRC 23 を制限酵素 BglII, EcoRI で消化し、 λ P L プロモーターを含む 265 bp の DNA 断片 (B) を分取した。(A), (B) と化学合成して得た蛋白合成開始コドンを含むオリゴヌクレオチドアダグター

A A T T C A T G C A C C G A T C C A

G T A C G T C C T A G G T A T
を T4 DNA リガーゼを用いて NdeI と EcoRI ののりしろ部分に結合させた。得られた DNA 断片を NcoI と BglII で処理して得たプラスミド pRC 23 / T F I - 900 に結合させ、Cys-
² Tyr-³ Cys 欠落 T F N - γ のポリペプチドをコードする発現プラスミド pLC 2 を構築した(第2 図)。このプラスミド pLC 2 を用いて Cohen らの方法 [プロシージングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス, 69, 2110 (1972)] に従って大腸菌 R R I (pRK 248 cI

ts) を形質転換し、形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli = E. coli) R R I (pLC 2, pRK 248 cI ts) を得た。

(ii) 形質転換体の培養

上記(i)で構築したプラスミドを含む菌株 E. coli R R I (pLC 2, pRK 248 cI ts) を 1% バクトリップトン, 0.5% 酪母エキス, 0.5% 食塩, 7 μ g/ml テトラサイクリンを含む液体培地 5.0 ml 中で、35°C, 12 時間振とう培養を行った。培養液を 0.5% カザミノ酸, 0.5% グルコース, 7 μ g/ml のテトラサイクリンを含む M9 培地 2.5 ml に移し、35°C 4 時間、ついで 42°C で 3 時間培養した。遠心分離して菌体を集め、-80°C で保存した。

(iii) 精製

上記(ii)と同様の方法で得た細胞菌体 7.1 g を 7 M 塩酸グアニジンおよび 2 mM フェニルメチルスルフォニルフルオライドを含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 2.2 ml に懸濁し、4°C で 1 時間攪拌したのち 10,000 × g で 30 分間遠心分離にかけ

て上清 2.4 ml を得た。この上清に 13.7 mM 塩化ナトリウム, 2.7 mM 塩化カリウム, 8.1 mM リン酸二ナトリウムおよび 1.5 mM リン酸一カリウムから成る緩衝液 (pH 7.4) 3.0 ml を加えて希釈し、抗体カラム ($M_0 \approx 2 - 11.1$, カラム容積 + 5 ml) に流速 1 ml/分でかけた。そののち、0.5M 塩酸グアニジンを含む 2.0 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 6.0 ml でカラムを洗浄し、ついで、2 M 塩酸グアニジンを含む 2.0 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 4.5 ml で溶出し、抗ウイルス活性を有する画分 2.5 ml を得た。この画分 2.5 ml をあらかじめ 1 mM エチレンジアミン四酢酸, 0.15M 塩化ナトリウム, 1.0 mM システインおよび 2 M 塩酸グアニジンを含む 2.5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファクリール S-200 (ファルマシア社製) のカラム (2.6 × 9.4 cm), カラム容積 5.0 ml にかけ、同一緩衝液で溶出して抗ウイルス活性を有する画分 4.0 ml を得た。

ここで得られた Cys-² Tyr-³ Cys 欠落 T F N - γ

のポリペプチド [デス(Cys-² Tyr-³ Cys)-T F N - γ] は、7.0 mg であり、比活性は 2.7×10^5 IU/mg であった。

(iv) 高濃度水溶液の製造

上記(iii)でえたデス(Cys-² Tyr-³ Cys)-T F N - γ を含む溶出画分 2.2 ml (タンパク濃度 0.18 mg/ml) を 0.5M 塩酸グアニジンを含む 2.5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) 17.6 ml で希釈した。この溶液をあらかじめ 2.5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファクリール S-200 カラム (2.6 × 15 cm) に負荷して、同一緩衝液で溶出し、塩酸グアニジンを除去したデス(Cys-² Tyr-³ Cys)-T F N - γ の溶出画分 2.3 ml (タンパク濃度 0.016 mg/ml) を得た。

本溶出画分を 4°C で 24 時間熟成したのち、ダイアフラム YM-10 (2.5 mmφ, アミコン社) を用いて膜外ろ過により濃縮し、フィルター (0.2 μ m) でろ過し、0.68 ml の澄明な溶液を得た。タンパク濃度は 0.41 mg/ml であった。

発明の効果

本発明の実質的に無機塩が存在せず、アミノ酸が共存する条件下に凍結もしくは凍結乾燥したrIFN- γ 組成物は、その凍結あるいは凍結乾燥操作および保存中においてIFN- γ 活性の低下が極めて少なくまたその再溶解時に漏りが生じないため医薬品等として有利に使用することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は146個のアミノ酸からなるrIFN- γ のアミノ酸配列の一例を示す。第2図は参考例6(i)に開示するプラスミドpLC2の構築図を示す。

代理人弁理士天井作次


1	Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu	20
	Ala Glu Asn Leu Lys Tyr Tyr Phe Asn Ala	
	Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr	40
	Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys	
	Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser	60
	Gin Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe	
	Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln	80
	Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met	
	Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys	100
	Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn	
	Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg	120
	Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Val Met	
	Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly	140
	Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg	
	Gly Arg Arg Ala Ser Gin	146

